

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

WO 02/32957 A1

Applicant's or agent's file reference YCT-646	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP01/08539	International filing date (day/month/year) 28 September 2001 (28.09.01)	Priority date (day/month/year) 16 October 2000 (16.10.00)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/505, A61K 38/32, 47/48, 47/34, A61P 7/06		
Applicant	CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA	

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:
I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II <input type="checkbox"/> Priority
III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 28 September 2001 (28.09.01)	Date of completion of this report 29 March 2002 (29.03.2002)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19) _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

pages _____, filed with the letter of _____

 the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP01/08539

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	2	YES
	Claims	1,3-8	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1 and 3-8

Document 1 [JP 9-25298 A (Amgen Inc.) 28 January 1997] cited in the international search report describes mono-PEG-modified interferon by PEG having a molecular weight of 2 to 100 KDa. Document 2 [WO 96/28475 A1 (Toshikazu Nakamura) 19 September 1996] cited in the international search report implies HGF in which sustained activity is improved by modification with PEG. Document 3 [JP 2-502646 A (Shau Grey) 23 August 1990] cited in the international search report implies modification of Lys residues of EPO with PEG. Document 4 [JP 2-9900 A (Kirin-Amgen Inc.) 12 January 1990] cited in the international search report describes EPO in which at least 1 of the Lys residues has been modified by PEG.

As shown above, the modification by PEG of physiologically active proteins was a well known technique that was widely used before the priority date of this application, and persons skilled in the art could easily conceive of modifying EPO with PEG. In addition, this examination finds that adopting the constitution of these inventions provides no particularly outstanding effect that could not be predicted by persons skilled in the art based on the description in document 2 and the like.

Therefore, the inventions set forth as Claims 1 and 3-8 do not appear to involve an inventive step.

Claim 2

Documents 1-4 do not describe mono-PEG-modified EPO in which the lysine residue at position 52 of the natural form of EPO has been modified by PEG. Furthermore, this examination finds that PEG modification of only a single lysine residue at position 52 from among the 8 lysine residues as described in the invention set forth as Claim 2 provides an effect that could not be predicted based on the descriptions in documents 1-4, and therefore the invention set forth as Claim 2 appears to involve an inventive step.

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2002年4月25日 (25.04.2002)

PCT

(10)国際公開番号
WO 02/32957 A1

- (51)国際特許分類⁷: C07K 14/505, (MIYAMOTO, Hajime) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).
- (21)国際出願番号: PCT/JP01/08539 (74)代理人: 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (22)国際出願日: 2001年9月28日 (28.09.2001) (81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25)国際出願の言語: 日本語 (84)指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (26)国際公開の言語: 日本語
- (30)優先権データ:
特願2000-315421 (71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72)発明者; および (75)発明者/出願人(米国についてのみ): 中村輝郎 (NAKAMURA, Teruo) [JP/JP], 関森泰男 (SEKIMORI, Yasuo) [JP/JP], 町田 実 (MACHIDA, Minoru) [JP/JP], 川田洋充 (KAWATA, Hiromitsu) [JP/JP], 宮本 創

添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54)Title: PEG-MODIFIED ERYTHROPOIETIN

(54)発明の名称: PEG修飾エリスロポエチン

(57)Abstract: A polyethylene glycol-modified erythropoietin (PEG-modified EPO) obtained by chemically modifying the lysine residue at the 52-position of natural erythropoietin (natural EPO) with polyethylene glycol. To enhance the long-lasting drug effect of EPO without damaging the physiological activity of EPO which is a sugar chain-rich glycoprotein, it has been required to develop a PEG-modified EPO having an extremely high long-lasting drug effect by introducing PEG into a controlled binding site at a controlled number of binding molecules. The above-described PEG-modified EPO shows a high long-lasting drug effect, thereby solving these problems.

(57)要約:

天然型エリスロポエチン(天然型EPO)の52位のリジン残基を、ポリエチレングリコールで化学修飾して得られるポリエチレングリコール修飾エリスロポエチン(PEG修飾EPO)を提供する。糖鎖に富む糖タンパクである天然型EPOの生理活性を損なうことなく、薬効持続性を高めるために、制御された結合位置、結合分子数でPEGを導入し、極めて高い薬効持続性を有するPEG修飾EPOの開発が望まれていたが、このPEG修飾EPOは、これらの課題を解決し、高い薬効持続性を示すものである。

WO 02/32957 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

P E G修飾エリスロポエチン

[技術分野]

5 本発明は、ポリエチレングリコール（PEG）で化学修飾した天然型ヒトエリスロポエチンに関し、更に詳細には、動物細胞を宿主として製造した組換えヒトエリスロポエチン（rhEPO）にPEGの反応性誘導体を反応させることにより得られる、52位のリジン残基にPEGを結合させたモノPEG修飾エリスロポエチン、これを含有する組成物及びこれらを有効成分として含有する薬効持続
10 性エリスロポエチン製剤に関する。

[背景技術]

エリスロポエチン（EPO）は、主に腎臓で産生され、造血組織の前駆細胞に作用して赤血球への分化・増殖を促進する糖鎖に富んだポリペプチドである。現在、EPOは、遺伝子組換え技術により、動物細胞を宿主として生産される組換
15 換えヒトEPOとして市販されており、腎障害に基づくEPO産生低下による腎性貧血を始め、各種の貧血症に対する治療薬として主として使用されている。

本発明における「天然型EPO」とは、人尿から種々の方法で抽出し、分離精製したもの、及びCHO細胞、COS細胞のような動物細胞を宿主として遺伝子組換え技術により製造されるヒト由来のEPOと同様な糖鎖を有する組換えヒト
20 EPO（rhEPO）を意味する外、さらに、これらEPOを構成するアミノ酸の1又は2以上を置換、欠失し、又は1又は2以上のアミノ酸を付加したEPO改変体を含むものとする。

現在使用されているEPOは静脈内、皮下、筋肉内等の経路により投与される。EPOの活性は、赤血球の前駆体である網状赤血球の赤血球に占める割合を1つの指標として示すことができる。この網状赤血球割合によって観察される天然型EPO活性は、上記のいずれの投与経路でも投与後3～5日目にピークを示し、以後急速に減少する。したがって、貧血症患者において十分な治療効果を維持するためには1週当たり2～3回の頻度で注射によりEPOを投与することが必要と

され、患者に苦痛を与えるばかりでなく、多忙な医師およびその他の医療従事者の作業量を増加させている。更に、一定期間内の投与回数を減少させることで、医療コストの削減も期待される。

一方、例えば、タンパク質又は糖タンパク上の酸化活性可能な官能基であるポリオール、ラクトール、アミン、カルボン酸又はカルボン酸誘導体との化学反応により、共有結合できるヒドラジド又はオキシルアミン部分を有する水溶性高分子（例えば、PEG）により修飾されたタンパク質又は糖タンパクが報告されている（例えば、特開平7-196925号公報）。この報告によれば、水溶性高分子、例えばPEGは、タンパク質又は糖タンパクを構成するアミノ酸又は糖の種々の遊離基に結合して、1分子のタンパク質に対して6～34個のPEG（分子量2000～12000）をカップリングさせている。このように多数のPEGを結合させるPEG修飾タンパク質又は糖タンパクではPEGの結合位置、結合個数を制御することが難しく、均一なPEG修飾タンパク質又は糖タンパクを得ることは困難である。したがって、この方法によって得られるPEG修飾タンパク質又は糖タンパクを医薬品として製剤化することは問題がある。

また、スルホネートエステル活性化ポリマー、例えば、スルホネートエステル活性化PEGが開示され、このスルホネートエステル活性化ポリマーと標的物質、例えばタンパク質又は糖タンパクとを反応させて、ポリマー修飾標的物質を製造する方法も提案されている（特表平9-504515号公報）。このスルホネートエステル活性化ポリマーと反応する標的物質上の反応基としては第一級又は第二級アミノ基、チオール基及び芳香族ヒドロキシル基が包含される。このように、種々の反応基と反応するスルホネートエステル活性化ポリマーは、カップリングで導入される修飾ポリマーの数、結合位置等の制御は困難であると判断される。また、スルフォネートアミドを形成する可能性も明らかにされており、生成物のヘテロジエニティーは一層、高いものとなる。

更に、分枝鎖ポリマー、例えば分枝PEGを標的物質であるタンパク質又は糖タンパク等に付加して、標的物質の分枝鎖ポリマー複合体を与えることが報告されている（特表平9-504299号公報）。この分枝ポリマー修飾標的物質も優

れた薬効持続性を有するが、さらに高い持続効果を示すポリマー修飾EPOの開発が望まれていた。

また、修飾させるPEGの分子量が大きい程、高い持続効果が得られるものと考えられていた。

5. 修飾させるPEGの分子量が大きくなるとインビトロの活性は低下する。ところが、PEGの分子量が大きくなるとそれに依存してインビボでは血漿中滞留性が目覚ましく向上するために活性が持続化して、PEGの分子量の増大に依存して高い活性と活性の持続効果が得られる (Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins; PSTT Vol.1, No.8, 1998, 10 352-356) と考えられていた。例えば、G-CSFミューテインのPEG修飾複合体では、修飾させたPEGの計算上の分子量がおよそ10kDaから60数kDaにおいて、インビボの活性がPEGの分子量に比例して上昇する (PCT/US00/01264, WO 00/44785) ことが知られている。

従来のEPOのPEG修飾複合体では分子量が5kDa程度の比較的分子量が15 小さいPEGを多数付けることで薬効の持続化を図っていた。しかし、糖鎖に富むEPOにおいては、糖鎖構造に覆われていないレセプター結合に関する限られたアミノ酸残基が多数修飾部位として使われてしまうため、インビボ活性の低下が避けられず、薬効の持続化とインビボ活性の低下とのバランスが困難であった。また、前述の如く10kDa以上のPEGをアミノ基あるいは糖鎖に修飾した例でもPEGの数の制御の問題で、現実に医薬品化を目指すことが困難であった。

[発明の開示]

そこで糖鎖に富む糖タンパクであるEPOの生理活性を損なうことなく、薬効持続性を高めるために、制御された結合位置、結合分子数でPEGを導入し、極めて高い薬効持続性を有するPEG修飾EPOの開発が望まれている。

前に述べたように、修飾させるPEGの分子量とインビボ活性の関係については、一般的にPEGの分子量が大きい程、高い血漿中滞留性が得られ、その結果、高い薬効と薬効持続性が得られると考えられていた。しかし、本発明者は糖鎖を

有する天然型（組換え）EPOのPEG修飾に関しては、この一般論は当てはまらず、修飾させるPEGが極めて高分子量のものではインビボ活性も低下することを明らかにし、このバランスを得るためにPEGの分子量は大きい程良いというものではなく、ある一定の範囲の分子量のPEGが有効であることおよび、
5 特定の結合分子数において極めて優れた薬効持続性効果を有することを見出し、本発明を完成した。

本発明者等は、活性エステルを片末端に有するポリエチレングリコール（PEG）誘導体、例えば、メトキシPEG-サクシンイミジル低級脂肪酸エステルを組換えヒトEPOに反応させることにより、PEG修飾EPOを製造した。この
10 PEG修飾EPOは、rhEPO1分子当たり1から3分子の直鎖型PEGが結合した組成物からなる。モノ-メトキシPEG-EPO（mono-mPEG-EPO）は、rhEPOの主として52位のリジン残基のアミノ基に直鎖型PEGが結合しており、rhEPO1分子当たり、1分子のPEGが結合している。後に詳しく説明するが、本発明者等はまず、初めに、本発明のPEG修飾EPO
15 は、天然型未修飾EPOに比較して顕著に高い薬効持続性を示すことを確認した。

更に、本発明者等は、PEG修飾EPOの分子量の測定に際し、従来より行われているTOF-MSによる分子量測定の他に、生体内におけるPEG修飾EPOの分子の大きさに関わる挙動を予測するために、実施例2で詳細に述べたように水系溶媒によるゲル濾過カラムクロマトグラフィーにて、球状蛋白質を分子量
20 マーカーとして見掛けの分子量を測定した。その結果、驚くべき事に、糖鎖構造に富む天然型EPOのPEG修飾複合体は見掛けの分子量が100kDaを越え、分子量40kDaのPEGを用いて修飾したPEG修飾天然型EPOにおいては、見掛けの分子量がおよそ800kDaあるいはそれ以上になることを見いたした。天然型EPOは糖鎖に富むことで限られた露出蛋白質構造部分がレセプターとの
25 結合に関与することが知られていることと、ここで着目した見掛けの分子量の驚くべき大きさから、我々は、天然型EPOに対するPEG修飾においては、むしろ、修飾するPEGの分子量および分子数を制御して、薬効最適化を図る必要があると考えた。

そこで、更に、分子量 5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa 及び 30 kDa の直鎖PEG1 分子が天然型EPO1 分子に結合したモノーメトキシPEG-EPO (mono-mPEG-EPO)、分子量 5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa 及び 30 kDa の直鎖PEG2 分子が天然型EPO1 分子に結合したジーメトキシPEG-EPO (di-mPEG-EPO) 並びに、分子量 10 kDa、20 kDa 及び 40 kDa の2分枝型PEG1 分子が天然型EPO1 分子に結合したモノ一分枝型メトキシPEG-EPO (mono-mPEG2-EPO) をそれぞれ調製した。後の実施例の中で詳しく述べているように、これら3種のPEG修飾EPOの比較では、血漿中滞留性については、モノーメトキシPEG-EPOに比べ、ジーメトキシPEG (di-mPEG-EPO) とモノ一分枝型メトキシPEG-EPO (mono-mPEG2-EPO) が優れていたのに対して、インビボの赤血球造血効果ではモノーメトキシPEG-EPOの方が優れていることを明らかにして、天然型EPOに対して最適なPEG修飾の範囲が存在するとの前述の本発明者等の考えを立証した。

15 [図面の簡単な説明]

図1は、本発明方法でPEG修飾したEPO (モノ-mPEG-EPO) 及びジ-mPEG-EPO、非修飾EPO等のSDS-PAGEを示した図である。

図2は、本発明のモノ-mPEG-EPOをエンドプロテアーゼLyS-Cで消化した後、溶液クロマトグラフィーによりマッピングしたクロマトパターンで20ある。

図3は、本発明のモノ-mPEG-EPOを含む、PEG修飾EPOのEPO依存性細胞に対する増殖活性を示すグラフである。

図4は、本発明のモノ-mPEG-EPOを含む、PEG修飾EPO投与による末梢網状赤血球数の変化を示すグラフである。

25 図5は、本発明のモノ-mPEG-EPOを含む、PEG修飾EPO投与によるヘモグロビン値の変化を示すグラフである。

図6は、本発明のモノ-mPEG-EPO及びモノ一分枝型mPEG-EPOを含む、PEG修飾EPO投与による末梢網状赤血球数の変化を示すグラフであ

る。

図7は、本発明のモノ-mPEG-EPO及びモノ-分枝型mPEG-EPOを含む、PEG修飾EPO投与によるヘモグロビン値の変化を示すグラフである。

図8は、本発明のモノ-mPEG-EPO (PEG (1)-EPO) のヘモグロビン値における用量依存性を示すグラフである。

図9は、本発明のモノ-mPEG-EPO (PEG (1)-EPO) 単回投与とEPO 5日間連続投与との比較を示すグラフである。

図10は、本発明のモノ-mPEG10K-EPO、モノ-mPEG15K-EPO、モノ-mPEG20K-EPOを含む、PEG修飾EPOのEPO依存性細胞に対する増殖活性を示すグラフである。

図11は、本発明のモノ-mPEG5K-EPO、モノ-mPEG20K-EPO、モノ-mPEG30K-EPOを含む、PEG修飾EPOのEPO依存性細胞に対する増殖活性を示すグラフである。

図12は、本発明のモノ-mPEG5K-EPO、モノ-mPEG10K-EPO、モノ-mPEG15K-EPO、モノ-mPEG20K-EPO、モノ-mPEG30K-EPOを含む、PEG修飾EPO投与による末梢網状赤血球数の変化を示すグラフである。

図13は、本発明のモノ-mPEG5K-EPO、モノ-mPEG10K-EPO、モノ-mPEG15K-EPO、モノ-mPEG20K-EPO、モノ-mPEG30K-EPOを含む、PEG修飾EPO投与によるヘモグロビン値の変化を示すグラフである。

図14は、本発明のモノ-mPEG5K-EPO、モノ-mPEG10K-EPO、モノ-mPEG15K-EPO、モノ-mPEG20K-EPO、モノ-mPEG30K-EPOを含む、PEG修飾EPO投与による末梢網状赤血球数のAUCを示すグラフである。

[発明の実施の形態]

本発明のPEG修飾EPOを医薬品化する際には、以上の事柄から、例えば、天然型EPOの主として52位のリジン残基のアミノ基にPEGが結合している

モノーメトキシPEG-EPO (mono-mPEG-EPO) の高度精製物を用いることが望ましいが、例えば、モノーメトキシPEG-EPO (mono-mPEG-EPO) を主成分とし、さらに、ジーメトキシPEG-EPO (di-mPEG-EPO) 等もその生成反応時に副産物としてできる活性関連物質として含めて製剤化することも可能であると考えられる。
5

本発明によりPEG修飾されるEPOは、市場で入手可能な動物細胞を宿主として製造される組換えヒトEPOの外、このEPOを構成するアミノ酸の1又は2以上を置換、欠失し、又は1又は2以上のアミノ酸を付加したEPO改変体を含むものとする。

10 本発明において、PEG修飾に使用されるPEG誘導体としては、片末端をメトキシ化したものが使用できる。また、EPOのアミノ基と反応させるためにメトキシ化されていない片末端をサクシンイミジル低級脂肪酸エステル化したPEG、好ましくは、サクシンイミジル・プロピオン酸エステル化したPEG又はサクシンイミジル・酪酸エステル化したPEG（それぞれ、SPA-PEG又はS
15 BA-PEG）が使用できる。これらPEG誘導体は、反応のために活性化した末端以外に主鎖にエステル部分を持たないため安定なPEG修飾複合体を与えることができる。

天然型EPOが赤血球前駆細胞のEPOレセプターに結合し、細胞を赤血球に分化させるシグナルを伝えるためには、それに必要な蛋白質構造領域が露出して
20 いる必要がある。ところが、天然型EPOは、他の組換え蛋白質医薬品と比べても糖鎖含量が極めて高く、僅かな露出蛋白質部分にレセプターへの結合とシグナル伝達に必要な領域が存在している。従って、露出した限られた蛋白質部分に対する修飾、特に高分子化合物による修飾を行うとEPO活性を低下させて、薬効持続化医薬品の創出という本来の目的を達成できない可能性が危惧される。

25 本発明では、上述のような特殊な条件下にある天然型EPOにおいて、EPO活性への影響をレセプターへの結合レベルでは多少与えるものの、インビボにおいては天然型EPOに勝る薬効とその持続性を得るために、修飾するPEGの望ましい分子量と修飾部位を明らかにして発明を完成させた。

PEG修飾される可能性があるアミノ酸残基として、天然型EPOには、いくつからリジン残基が存在するが、特に52位のリジン残基のアミノ基がPEGで修飾されたPEG修飾EPOが好ましい。本発明には、主として52位のリジン残基のアミノ基がPEGで修飾されたPEG修飾EPO組成物が態様の一つとして
5 含まれる。

この場合のPEG修飾EPO組成物としては、52位のリジン残基のアミノ基がPEGで修飾されたモノPEG修飾EPOを含有し、他の位置のアミノ酸残基が1分子のPEGで修飾されたモノPEG修飾EPO及び／又は天然型EPOのアミノ酸残基のうち2残基以上がPEG修飾されたPEG修飾EPOを含有する
10 PEG修飾EPO組成物である。この組成物中に含まれるPEG修飾EPOは、好ましくは、EPO1分子に対し1から3分子、さらに好ましくはEPO1分子に対し1分子のPEGで修飾されたPEG修飾EPOである。

このPEG修飾EPO組成物中の組成としては、52位のリジン残基のアミノ基がPEGで修飾されたモノPEG修飾EPOと、他の位置のアミノ酸残基が1
15 分子のPEGで修飾されたモノPEG修飾EPO及び／又は天然型EPOのアミノ酸残基のうち2残基以上がPEG修飾されたPEG修飾EPOの組成物が好ましい。

修飾に使用されるPEGの分子量は、得られるPEG修飾EPOに要求される薬効持続効果の程度、EPO活性の低下の程度等により適宜変更することができるが、PEG1分子の分子量は、5～40kDa、好ましくは、10～30
20 kDa、さらに好ましくは20～30kDaであり、同じ分子量であれば直鎖PEGが分枝PEGに比べて好ましい。PEG修飾EPOの水系溶媒中における見掛けの分子量としては、例えば実施例2に記載の条件におけるゲルfiltrationカラムクロマトグラフィーによる分子量測定で100～900kDa、好ましくは、15
25 0～650kDa、さらに好ましくは400～650kDaである。

修飾に使用されるPEGの分子形態は好ましくは直鎖型であるが、PEG修飾EPOの見掛けの分子量が前述の範囲となるようなPEGであれば、分枝型あるいは星型等でも使用可能であり、PEG修飾されるアミノ酸残基は前述と同様で

ある。

PEG修飾EPOの精製方法は、PEG／デキストラン2相分配、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィーなどが挙げられる。

5 本発明で得られるPEG修飾EPOの生理活性、薬効持続性等について、下記の各項目について未修飾の天然型EPO、ジーメトキシPEG-EPO及びモノ一分枝PEG-EPOを含めてベヒクルとの比較試験を行い、本発明のPEG修飾EPOが非修飾の天然型EPOに比べてインビボで薬効およびその持続性において優れていることが確認された。更に、修飾に用いた直鎖PEGの分子量が2
10 0～30kDaで直鎖PEG修飾EPO全体の見掛けの分子量が400～650kDa（実施例2および9参照）であり、主に52位のリジン残基のアミノ基がPEG修飾されたモノーメトキシPEG-EPOは、インビボで極めて優れた薬効およびその持続性を有することが確認された。

更に詳細に述べるとラットを使用した未修飾天然型EPO、本発明のPEG修飾EPO尾静脈内単回投与後における未修飾天然型EPOおよびPEG修飾EPOの血漿中滞留性を検討したところ、一般に考えられている通り、修飾に用いたPEGの分子量および分子数が多くPEG修飾EPO全体の見掛けの分子量が大きい程、血漿中滞留性が優れていた。

一方、PEG修飾EPOによるEPO依存性細胞（BaF/EpoR細胞）に対するインビトロ増殖活性を測定したところ、本発明のPEG修飾EPOは未修飾天然型EPOに比べてインビトロ増殖活性の低下が観察されたものの、活性を失ってはいなかった。即ち、PEG修飾によりレセプターとの結合親和性に影響は生じたものの、レセプターと直接結合する部分を完全には遮蔽していないことが予想される。本発明のPEG修飾EPOの中でもモノーメトキシPEG-EPOは、他のPEG修飾EPOに比較して明らかに高い活性を示した（実施例4参照）。

更に、ラットを使用したインビボ試験による、未修飾天然型EPO、本発明のPEG修飾EPOの尾静脈内単回投与後における網状赤血球数及びヘモグロビン

値の変化を測定したところ、いずれも本発明のPEG修飾EPOが優れた効果を示すことが確認された。一般的なPEG修飾蛋白質と異なり本発明のPEG修飾EPOでは、中でも修飾に用いたPEGの分子量が10～30kDaでPEG修飾EPO全体の見掛けの分子量が150～650kDaであり、主に52位のリジン残基のアミノ基がPEG修飾されたモノーメトキシPEG-EPOは、網状赤血球数及びヘモグロビン値の測定結果から極めて優れた効果を示すことが確認されている（実施例5および11参照）。

本発明によるPEG修飾EPO、好ましくはモノーメトキシPEG-EPOを用いることにより、エリスロポエチンの投与間隔が従来より延長され、例えば週2から3回投与を週1回に、週1回投与を10日から2週間間隔にすることが可能になる。従って、患者の通院回数や痛みを伴う注射の回数を減らすことによる肉体的および時間的負担の軽減さらに、医療従事者の負担の軽減による医療コストの削減が可能になる。

投与量は貧血を引き起こす病因や貧血の程度、年齢等および個々の患者のエリスロポエチンに対する反応性によって適宜調節する必要があることから一義的には決められないが、例えば成人に対する静脈内注射では週1回投与の場合、成人1人当たり1～100マイクログラム、好ましくは5～50マイクログラムとなることが予測される。

本発明によるPEG修飾EPOは、静脈内注射、点滴静脈内注射、皮下注射、経粘膜投与（例えば経肺、経鼻など）、経皮投与などの投与経路により患者へ投与することができる。

採用する投与方法にあわせて、溶液製剤、凍結乾燥製剤、プレフィルドシリンジ、無痛針あるいは無針型皮下投与製剤、あるいは皮内埋め込み型の徐放製剤（例えばマイクロカプセル、高分子ミセル、高分子を含むゲル化製剤、リポソームなど）などに製剤化することが可能であり、天然型エリスロポエチンよりも安定な製剤を提供することができる。徐放製剤においては、徐放製剤中のエリスロポエチン活性がPEG修飾により安定化されること、およびPEG修飾エリスロポエチンが天然型エリスロポエチンよりも血漿中滞留性が極めて長いことから、天然

型エリスロポエチン徐放製剤よりも更に有用である。

以下に実施例により本発明を更に詳しく述べるが、本発明を限定する意味に解釈してはならない。

[実施例 1] PEG修飾EPOの調製 (1)

5 (mono-mPEG-EPO及びdi-mPEG-EPOの調製)

rhEPO溶液 (pH 8.0、100mMリン酸緩衝液) にPEGの分子量が約20kDaのmethoxyPEG-SPA (サクシンイミジルプロピオン酸エステル) (Shearwater Polymers社製) (以下、mPEG-SPAという) を加え、室温下に30分間攪拌した。100mMグリシン溶液を10 10%容量添加し、室温下にさらに30分間攪拌して活性エステルの失活を図った。以上的方法で、4回の反応を行った。各反応時のrhEPO溶液濃度と溶液量、添加したmPEG-SPAのrhEPOに対するモル比を表1に示した。各反応液についてCentrificon-50 (Millipore社製) で濃縮しつつ、溶媒をpH 7.4、20mMリン酸緩衝液-150mM NaClに置換15 した。

表1 PEG修飾EPOの反応

		反応 1	反応 2	反応 3	反応 4
	EPO濃度 (mg/mL)	2.94	1.75	2.81	2.4
20)	5			
	EPO溶液量. (mL)	0.50	2.31	2.50	2.0
)		4			
	mPEG-SPA 添加モル比	3.97	5.00	5.08	5.0
		3			
	(EPO 1モル当たり),				

各濃縮液を、表1に示した反応1ではそのまま、反応2以降では2から4回に25 分けてSuperdex 200 HR 10/30 (Pharmacia Biotech社製)によるゲルfiltration法で精製し、mono-mPEG-EPO画分とdi-mPEG-EPO画分をそれぞれ回収した。反応2以降では、mono-mPEG-EPO画分とdi-mPEG-EPO画分にまたがり、両者が混合

して溶出された画分を別途に回収し再度 Superdex 200 HR 10 / 30 にて精製して mono-mPEG-EPO 画分と di-mPEG-EPO 画分をそれぞれ回収した。一連の精製によって得られたそれぞれの画分を合わせて mono-mPEG-EPO を 3.8 mg、di-mPEG-EPO を 1.6 mg 回収した。回収した mono-mPEG-EPO 及び di-mPEG-EPO をそれぞれ孔径 0.22 マイクロ m の Millipore フィルター (Millipore 社製) にて無菌的に濾過して di-mPEG-EPO を 1.6 mg、mono-mPEG-EPO を 3.8 mg 得た。これらの試料 (約 0.75 mg/mL、ゲルの試料溝への添加試料量各 1 マイクロ L) の SDS-PAGE 泳動を Phast Gel 1 Gradient 4-15 (Pharmacia Biotech 社製) にて行い、Phast Gel Blue R (Pharmacia Biotech 社製) にて染色した (図 1 参照、図中の EPO は rh EPO の意)。

なお、rh EPO 及び PEG 修飾 EPO の定量値は波長 279 nm の吸光度を測定し、本実施例においては rh EPO 1 mg/mL 溶液の波長 279 nm における吸光度を 0.93 (生化学データブック記載値) として算出した。なお、他の実施例では 281 nm における吸光度を 1.31 として算出した。

[実施例 2] PEG 修飾 EPO の分子量測定 (1)

(直鎖 PEG 修飾 EPO の分子量測定)

rh EPO 0.49 mg/mL (pH 8.0 100 mM リン酸緩衝液) 96
20 0 マイクロ L に PEG の分子量が約 20 kDa の mPEG-SPA 5.32 mg (mPEG-SPA / rh EPO = 10.2 (mol/mol)) を加え、室温下に 1 時間穏やかに攪拌した。1 M Gly 溶液 100 マイクロ L を加えた後、PBS 500 マイクロ L を加えて稀釀、Centricon-50 で 390 マイクロ L まで濃縮した。濃縮液を、2 本連結した Superose 6 HR 1
25 0 / 30 (1.0 x 30 cm、ベッド体積 24 mL、Pharmacia Biotech 社製) に添加して、PBS にて溶出させて、di- 及び mono-mPEG-EPO 画分をそれぞれ分取した。

得られた di- 及び mono-mPEG-EPO 画分をそれぞれ Centri

con-50でMilli-Q水に溶媒置換しつつ濃縮した後TOF-MSにて、MatrixにSinapinic acid 4.05mg/405マイクロL 50% MeCNを用い、測定試料/Matrixを5マイクロL/5マイクロLとしてBSAにてCalibrationして分子量を測定した。

一方でゲル濾過法による分子量測定のため、TOF-MS測定に共した試料溶液(30-35マイクロL)をPBS 200マイクロLで稀釀し、2本連結したSuperose 6 HR 10/30 (1.0 x 30 cm、ベッド体積24mL、Pharmacia Biotech社製)に添加して、PBSにて溶出させて、未処理のrhEPO、di-及びmono-mPEG-EPOそれぞれの溶出時間を測定した。ゲル濾過用分子量Calibration kit (Amersham Pharmacia Biotech社製)から①Thyroglobulin: MW 669000、Aldolase: 158000、Chymotripsinogen A: 25000、②Ferritin: 440000、Ovalbumin: 43000の混合スタンダード溶液を調製し、同条件にてゲル濾過を行った。各標準品の溶出時間から検量線を作成し、rhEPO、di-及びmono-mPEG-EPOの分子量を求めた。

(分枝型PEG修飾EPOの調製と分子量測定)

rhEPO 2.27mg/mL (pH 8.0 100mMリン酸緩衝液) 500マイクロLにPEGの分子量が約40kDa (20kDa x 2) のbranched mPEG2-NHS 5.32mg (branched mPEG2-NHS/rhEPO = 2.99 (mol/mol)) を加え、室温下に30分間穏やかに攪拌した。1M Gly溶液 (pH 8.0 20mM Tris·HCl) 50マイクロLを加えた後、更に室温下に30分間攪拌した。Centrifuge-50で溶媒をpH 8.0 20mM Tris·HClに交換し、終容量を750マイクロLに調整した。これをResourse Q 1mL (Pharmacia Biotech社製) を用いたイオン交換クロマトグラフィーにて溶出液A (pH 8.0、20mM Tris·HCl) に対して溶出液B (pH 8.0、20mM Tris·HCl、0.5M NaCl) の0%から50%

グラジェントで溶出された分枝型PEG修飾EPOを含む画分を分取し、Centrificon-50で375マイクロLまで濃縮した。これにPBS 25マイクロLを加え、2本連結したSuperose 6 HR 10/30 (1.0 x 30 cm、ベッド体積24mL、Pharmacia Biotech社製)に5 添加して、PBSにて溶出させて、di-mPEG 2-EPO (di-分枝型mPEG-EPO) およびtri-mPEG 2-EPO (tri-分枝型mPEG-EPO) 画分ならびにmono-mPEG 2-EPO (mono-分枝型mPEG-EPO) 画分を分取した。得られた2画分をそれぞれCentrificon-50でMilli-Q水に溶媒置換しつつ濃縮した後TOF-MSにて、MatrixにSinapinic acid 4.05 mg/405マイクロL 50% MeCNを用い、測定試料/Matrixを5マイクロL/5マイクロLとしてBSAにてCalibrationして分子量を測定した。

一方でゲル濾過クロマトグラフィー法による分子量測定のため、TOF-MS 測定に共した試料溶液をPBS 200マイクロL (di-、tri-) あるいは150マイクロL (mono-) で稀釀し、2本連結したSuperose 6 HR 10/30 (1.0 x 30 cm、ベッド体積24mL、Pharmacia Biotech社製)に添加して、PBSにて溶出させて、未処理のrhEPO、di-及びmono-mPEG-EPOそれぞれの溶出時間を測定した。ゲル濾過用分子量Calibration kit (Amersham Pharmacia Biotech社製)から①Thyroglobulin: MW 669000、Aldolase: 158000、Chymotrypsinogen A: 25000、②Ferritin: 440000、Ovalbumin: 43000の混合スタンダード溶液を調製し、同条件下にゲル濾過クロマトグラフィーを行った。各標準品の溶出時間から検量線を作成し、mono-mPEG 2-EPO (mono-分枝型mPEG-EPO) の分子量を求めた。

rhEPO、di-及びmono-mPEG-EPO及びmono-mPEG 2-EPO、mono-分枝型mPEG-EPO) の分子量を表2 (表中のEPOはrhEPO、Linearは直鎖型、Branchedは分枝型の意) に示

した。

表2 PEG修飾EPOの分子量

5		分子量 理論値 (Da)	分子量測定値 (Da)	
			ToF-MS	ゲル濾過法
	EPO	29000 ¹⁾	28400	70000
Liner	mono-mPEG-EPO	50000	49800	402000
PEG	di-mPEG-EPO	71000	71300	914000
Branched	mono-mPEG ₂ -EPO	71000	71200	823000
10	PEG	di-mPEG ₂ -EPO	113000	113000 (2080000) ²⁾

1) 臨床医薬6巻Suppl.2(5月) 1990 p.24 EPOCHの推定分子量
(化学分析法)

2) 検量線範囲を超えたため、参考値として記載

[実施例3] PEG結合部位の同定

15 実施例1で製造したPEG修飾EPO (mono-mPEG-EPO) について、PEG結合部位を同定した。

mono-mPEG-EPO (図2ではPEG(1)-EPOと表記) 及び非修飾rhEPO (図2ではintact EPOと表記) について、エンドプロテアーゼ Lys-Cによる消化後、RP/C18カラムによるペプドマッピング (peptide mapping) を行った。

(実験方法)

サンプルは、PEGの分子量が約20kDaのmono-mPEG-EPO (786マイクロg/mL) 及びrhEPO (1mg/mL) を使用した。

a) 還元カルボキシメチル化 (RCM化)、Lys-C消化

25 変性溶液は300mMリン酸緩衝液 (pH8.0) / 6Mグアニジン塩酸 / 6mM EDTAを使用。各種EPO 50マイクロg相当に対し5倍容量の変性溶液を添加、DTTを1.5マイクロmole (Cysの50倍量) 加え、室温で

一晩変性・還元した。モノヨード酢酸を3.15マイクロmole (DTTの2.1倍量) 添加、室温・暗所で45分反応させカルボキシメチル化した後、5.0mM Tris・HCl (pH 8.5) に対して透析を行った。Lys-Cを1マイクロg (基質:酵素比=50:1) 添加して37°Cで一晩消化し、10%TFAを1/10量添加後、ペプチドマッピングを行った。

b) ペプチドマッピング

カラムはVydac C18 (218TP52、2.1mm x 250mm)、LCはSMART system (Pharmacia社製) を使用。流速は1.0マイクロL/分、検出は220、280nm。溶媒とグラジエントは以下の通りである。

・A: 0.1% TFA

・B: 90% MeCN/0.1% TFA

5% B/15分、5-100% B/85分、100% B/10分、

得られたクロマトパターンを図2に示す。

mono-mPEG-EPO (図2ではPEG(1)-EPOと表記) と非修飾rhEPO (図2ではintact EPOと表記) を比較すると、L4がほぼ消失し、L3 (図2のL3&L6ピーク) が明らかに減少している。このことからL3とL4の境目のLys52がPEG修飾されている可能性が高いと考えられる。またL5とL4の間に新たなピークが出現しており、これがPEG修飾ペプチドと考えられる。またL4は完全には消失していないこととわずかにL1が減少していることから、L1のN末端 (Ala1) がPEG修飾されている分子種も存在すると考えられる。クロマトパターンから、全体の70~80%がLys52でPEG修飾されたものと考えられる。

[実施例4] PEG修飾EPOのEPO依存性細胞に対する

細胞増殖活性の測定 (1)

EPO依存的に増殖するBaF/EpoR細胞 (Blood, 90, 1867-、1997, PNAS, 93, 9471-、1996) を、2%FCS含有 RPMIで4回再懸濁と遠心分離を繰り返して洗浄した後に10%FCS含有RPMIで

M I にて 1×10^6 細胞／10 mL になるように懸濁し、96穴プレートに1穴当たり50マイクロLずつ添加した。一方、測定試料については、10% F C S 含有R P M I を希釀液に用いてE P O並びに実施例1及び2で製造したm o n o -m P E G -E P O、d i -m P E G -E P O、m o n o -分枝型m P E G -E P Oの希釀列をそれぞれ調製して、1穴当たり50マイクロLの試料液を $n=3$ であらかじめB a F /E p o R 細胞を添加した96穴プレートに添加して混合し、37°C、5% C O₂ 加湿下で24時間培養した。各穴に、1穴当たり10マイクロLのC e l l C o u n t R e a g e n t S F (ナカライトスク社製) を添加して450 nmと620 nmの波長で吸光度を測定して0時間の測定値とした。さらに室温で6時間静置して450 nmと620 nmの波長で吸光度を測定した結果をグラフ化した(図3参照、図中のm o n o はm o n o -m P E G -E P O、d i はd i -m P E G -E P O、b r a n c h e d はm o n o -分枝型m P E G -E P O、E p o はr h E P Oの意)。得られた結果について、用量-反応性について直線性がみられる3点を直線回帰し、E D 5 0 値と95%信頼区間をS A Sを用いて求め、表3(表中のb r a n c h e d -m P E G -E P Oは、m o n o -分枝型m P E G -E P Oを意味する)にまとめた。

表3 E P Oの依存性細胞に対する増殖活性

	ED50 (ng/mL)	95%信頼区間	比活性
20 r h E P O	0.12	0.10-0.14	1.0
mono-mPEG-EPO	0.94	0.73-1.2	0.13
d i -m P E G -E P O	15	13-18	0.0079
b r a n c h e d m P E G -E P O	3.0	2.4-3.8	0.040

25 [実施例5] m o n o -m P E G -E P O、d i -m P E G -E P O及びr h E P Oの薬効持続性の測定

被検物質として、実施例1で製造したm o n o -m P E G -E P O (786マ

イクロg/mL : rhEPO 1分子にmPEG 1分子結合) 及びdi-mPEG-EPO (640マイクロg/mL : rhEPO 1分子にmPEG 2分子結合) を用いた。これらはいずれもrhEPOのアミノ基に片末端活性エステル型mPEG (分子量約20kDa) を結合することによりPEG修飾し、ゲル濾過クロマトグラフィーにて精製したものであった。

投与液溶媒としては、0.05%ラット血清アルブミン、0.05%Tween 20を含む生理食塩水にPEG修飾EPO又はrhEPOを12.5マイクロg/mLに希釀した。投与溶媒のみ(ベヒクル)の投与を陰性対照とした。投与液の調製は投与初日に行った。本実施例では、S1c:SD系雄性ラット(日本エスエルシー株式会社)を7週齢にて実験に供した。被検物質投与日に赤血球数が各群ほぼ同じになるよう1群4匹ずつ4群に割り付けた。

ベヒクル投与群、rhEPO投与群、mono-mPEG-EPO投与群及びdi-mPEG-EPO投与群の4群を設定し、1群4匹とした。投与は2mL/kgの容量(試料濃度25マイクロg/kg)で単回尾静脈内投与した。

投与初日、投与後2、4、7、10、14、17、21、25、29、32、35、39日に無麻酔下でラットを保定器に保定し、尾静脈に注射針を刺し、傷口より流出する血液を採取して試料とした。各試料について、網状赤血球数及びヘモグロビン値について測定した。ヘモグロビン値はマイクロセルカウンター(Sysmex F-800、東亜医用電子株式会社製)で測定した。

各測定時点におけるヘモグロビン値及び網状赤血球数について、ベヒクル投与群とrhEPO投与群、mono-mPEG-EPO投与群及びdi-mPEG-EPO投与群の平均値の差の有意性をダンネット(Dunnett)の多重比較法により検定した。有意水準は両側5%とした。

測定の結果は、図4(末梢網状血球数の変化)、図5(ヘモグロビン値)に示した。また、造血促進効果の持続期間については、表4に要約した。

表4 PEG修飾EPOによる造血効果の有効期間

5 処置群	ヘモグロビン値を指標とした 有効期間（日間）, >ベヒクル ^a
rhEPO	1 (Day 4)
mono-mPEG-EPO	22 (Day 4-25)
di-mPEG-EPO	18 (Day 4-21)

^a : ベヒクル対照群との有意差有り ($P < 0.05$).

10 網状赤血球数は、いずれの投与群も投与後2日にベヒクル投与群に比べて有意に増加した。その後、rhEPO投与群では投与後4日で最大値に達し、投与後7日にはベヒクル投与群より低値にまで低下した。それに対して、mono-mPEG-EPO投与群では投与後10日まで、di-mPEG-EPO投与群では投与後7日までベヒクル投与群に比べて有意に高い値を示した。

15 ヘモグロビン値は、rhEPO投与群で投与後4日に最大値に達し、投与後7日にはベヒクル投与群とほぼ同程度の値にまで低下した。それに対して、mono-mPEG-EPO投与群では投与後14日に、di-mPEG-EPO投与群では投与後10日に最大値に達し、mono-mPEG-EPO投与群では投与後25日まで、di-mPEG-EPO投与群では投与後21日までベヒクル投与群に比べて有意に高い値を示した。ベヒクル投与群に比べて有意に高値を示した期間は、rhEPO投与群では投与後4日の1日間であったのに対して、mono-mPEG-EPO投与群では投与後4~25日の22日間、di-mPEG-EPO投与群では投与後4~21日の18日間であった（表4）。

20 [実施例6] mono-mPEG-EPO、mono-分枝型mPEG-EPO
25 及びrhEPOの薬効持続性の測定

以下の点を除き、実施例5と同様の比較実験を行った。活性エステルを有する分子量約40kDaの(methoxyPEG20000)₂誘導体(mPEG)

2 一サクシンイミジル・プロピオン酸エステルと r h E P O のアミノ基を反応させることにより作製した m o n o - 分枝型 P E G - E P O (b r - m P E G - E P O : 分枝型 P E G が 1 分子結合) と活性エステルを有する分子量約 2 0 k D a の m P E G 誘導体 (m P E G - サクシンイミジル・プロピオン酸エステルと r h E
5 P O のアミノ基とを反応させることにより作製した直鎖型 m o n o - P E G - E P O (m o n o - m P E G - E P O : 直鎖型 P E G が 1 分子結合) をラットに 5 及び 1 マイクロ g / k g の投与量で尾静脈内単回投与した時の赤血球造血に対する効果を比較検討した。被検物質投与日にヘモグロビン値が各群ほぼ同じになる
ように 1 群 5 匹ずつ群分けした。

10 被検物質は、投与初日、投与後 2 、 4 、 7 、 10 、 14 、 21 、 28 、 35 日に無麻醉下でラットを保定器に保定し、尾静脈に注射針を刺し、傷口より流出する血液を採取した。

測定の結果は、図 6 (末梢網状赤血球数の変化)、図 7 (ヘモグロビン値) に示した。また、造血促進効果の持続期間については、表 5 に要約した。なお、図 6 、
15 図 7 及び表 5 で表記されている b r - m P E G - E P O は m o n o - 分枝型 m P E G - E P O を指す。

表 5 P E G 修飾 E P O の投与量と造血促進効果の持続性

20	処置群	ヘモグロビン値を指標とした
		有効期間 (日間), > ベヒクル ^a
	mono-mPEG-EPO; 5 μ g/kg	13 (day 2-14)
	mono-mPEG-EPO; 1 μ g/kg	8 (day 7-14)
	br-mPEG-EPO; 5 μ g/kg	11 (day 4-14)
	br-mPEG-EPO; 1 μ g/kg	— ^b

^a : ベヒクル対照群との有意差有り ($P < 0.05$).

25 ^b : 対照群と処置群との間に有意差なし

網状赤血球数は、いずれの投与群も投与後 2 日にベヒクル投与群に比べて有意に増加し、投与後 4 日に最大値となった。網状赤血球数の最大値を比較すると、

mono-mPEG-EPO 5マイクロg/kg投与群が最も大きな値となつており、mono一分枝型mPEG-EPO 5マイクロg/kg投与群と、mono一分枝型mPEG-EPO 1マイクロg/kg投与群が同程度、mono一分枝型mPEG-EPO 1マイクロg/kg投与群が、最も小さな値となつてい
5 た。網状赤血球数が、ベヒクル投与群に比べて有意に高い値を示していた期間は、mono-mPEG-EPO投与群及びmono一分枝型mPEG-EPO投与群共に、5マイクロg/kg投与群では投与後2~7日の6日間、1マイクロg/kg投与群では投与後2~4日の3日間であった(図6)。

ヘモグロビン値は、mono-mPEG-EPO 5マイクロg/kg投与群
10 で投与後7日に最大値に達し、ベヒクル投与群に対して有意な増加が認められた期間は、投与後2~14日の13日間であった。mono一分枝型mPEG-EPO 5マイクロg/kg投与群とmono-mPEG-EPO 1マイクロg/kg投与群は、投与後4日に最大値を示し、ベヒクル投与群に対して有意な増加が認められた期間は、それぞれ、投与後4~14日の11日間と投与後7~1
15 4日の8日間であった。これに対して、mono一分枝型mPEG-EPO 1マイクロg/kg投与群は、実験期間を通じてベヒクル群との有意な差は認められなかった。(図7、表5)。

[実施例7] rhEPO及びPEG修飾EPOの薬効における用量依存性及び
PEG修飾EPOの薬効持続性

20 実施例1で製造したmono-mPEG-EPOの25マイクロg/kg以下の用量における薬効を確認するとともに、その効果をmono-mPEG-EPOの尾静脈内単回投与と、非修飾EPOの尾静脈内連続投与とを比較検討する。
(PEG修飾EPOの薬効における用量依存性)

mono-mPEG-EPOを25マイクロg/kg、5マイクロg/kg、
25 1マイクロg/kg、0.2マイクロg/kgの用量で8週齢の雄性ラット(各群5匹)に尾静脈内単回投与した時の造血効果の経時変化と用量依存性を検討した。

mono-mPEG-EPOを25マイクロg/kg、5マイクロg/kg、

1マイクロg/kg、0.2マイクロg/kgの用量でラットに尾静脈内単回投与した時のヘモグロビン値の変化を図8（図中mono-mPEG-EPOをPEG(1)-EPOと表記）に示した。投与後28日までの観察では、mono-mPEG-EPOのヘモグロビン最大値及び薬効持続期間は25マイクロg/kg投与群と5マイクロg/kg投与群がほぼ同程度と考えられ、1マイクロg/kg投与群、0.2マイクロg/kg投与群では投与量に依存してヘモグロビン最大値及び薬効持続期間が短縮しているものと考えられた。

（mono-mPEG-EPO尾静脈内単回投与とrhEPO尾静脈内5日間連続投与との薬効の比較）

10 mono-mPEG-EPO尾静脈内単回投与とrhEPO尾静脈内5日間連続投与との薬効を比較した。結果を図9（図中mono-mPEG-EPOをPEG(1)-EPOと表記）に示した。mono-mPEG-EPO 5マイクロg/kg単回投与とEPO 1マイクロg/kg 5日間連続投与（総投与量として5マイクロg/kgとなる）とを比較すると、mono-mPEG-EPO 15 5マイクロg/kg単回投与群の方がヘモグロビン値の最大値が高く、効果もより持続した。また、mono-mPEG-EPO 1マイクロg/kg単回投与とEPO 0.2マイクロg/kg 5日間連続投与（総投与量として1マイクロg/kgとなる）とを比較した場合では、両投与群のヘモグロビン値はほぼ同様の変化を示した。このことから、mono-mPEG-EPOはrhEPO 20 に比べて投与頻度を減らせることが強く示唆された。

[実施例8] PEG修飾EPOの調製（2）

（mPEG5K-EPOの調製）

EPO 2.27 mg/mL (pH 8.0 100 mMリン酸緩衝液) 1.3 mLをmPEG5K-SPA 3.38 mg (PEG/EPO = 4.09 (mol/mol))に加えて溶解させ、室温下に30分間穏やかに攪拌した。1 M Gly水溶液130 マイクロLを加えた後、更に室温下に30分間攪拌して反応を停止させた。これにPBS 550 マイクロLを加えて稀釀し、Centricon-50で325 マイクロLまで濃縮した。さらにPBS 150 マイクロLを加えた後、2本連結したSuperdex 200 HR 10/30 によるゲル濾過法で精製し、mono-mPEG5K-EPO、

di-mPEG5K-EPOおよびそれらの混合物を主に含むと考えられた画分として3画分を分取した。それぞれをCentricon-50で濃縮した後、同様の条件下に再度ゲル濾過に供し、それぞれからmono-mPEG5K-EPOおよびdi-mPEG5K-EPO画分を分取、混合し、mono-mPEG5K-EPO 210 マイクロgおよびdi-mPEG5K-EPO 5 218 マイクロgを得た。SDS-PAGEにより反応生成物と分取試料の分子量の対応を確認した。

(mPEG10K-EPO, mPEG15K-EPO, mPEG30K-EPO, br-mPEG10K-EPO,
および br-mPEG20K-EPOの調製)

以下に手順を示すが、反応条件 (①～④) の詳細は表 6 にまとめた。

- 10 EPO 溶液 (pH 8.0 100 mM リン酸緩衝液) (濃度①、溶液量②) をmPEG-SPA (直鎖型) あるいはbr-mPEG-NHS (分枝型) (溶液量③) (PEG/EPO 比 ④ (mol/mol))に加えて溶解させ、室温下に30分間穏やかに攪拌した。反応に供したEPO溶液の1/10量の1 M Gly水溶液を加えた後、更に室温下に30分間攪拌して反応を停止させた。Centricon-50を用いて溶媒をpH 8.0 20 mM Tris に置換し、
15 RESOURCE Q 1 mL を用いたイオン交換クロマトグラフィーにて実施例 2 と同様の溶出液Bの0から100%グラジエントで溶出されたPEG修飾EPOおよびEPOを含む画分をそれぞれ分取し、Centricon-50を用いてPBSに溶媒置換した。各溶液は、mPEG5K-EPO の調製に記した条件と同様にゲル濾過に供した。但し、mPEG15K-EPO、mPEG30K-EPO、およびbr-mPEG20K-EPOの調製においては
20 カラムを2本連結したSuperose 6 HR 10/30 (1.0cm ϕ ×30cm)(Pharmacia biotech 社製)に代えて行った。それぞれmPEGまたはbr-mPEGが1あるいは2分子EPOに導入されたと思われる分画を分取、濃縮した。異なるPEG導入量のmPEG-EPOs混合溶出画分は再度濃縮した後にゲル濾過に供し、mono-mPEG-EPOおよびdi-mPEG-EPOを分取した。
25 SDS-PAGEにより反応生成物と分取試料の分子量の対応を確認した。得られた試料の収率は表 7 の通りであった。

表6 PEG修飾EPOの反応条件

分子量 mPEG-SPA or br-mPEG-NHS	EPO 濃度 ① (mg/mL)	EPO 溶液量 ② (mL)	mPEG-SPA or mPEG-NHS ③ (mg)	PEG/EPO比 ④ (mol/mol)
直鎖型10kDa	1.75	1.0	2.91	3.12
直鎖型15kDa	1.75	1.0	4.43	2.97
直鎖型30kDa	1.82	1.1	10.95	3.16
分枝型(br)10kDa	2.43	0.7	5.07	4.93
分枝型(br)20kDa	2.43	0.7	9.67	4.93

10

表7 PEG修飾EPOの収量

15

Type of PEG	収量 (マイクロg EPO)	
	mono-PEGylated	di-PEGylated
mPEG10K-	257	146
mPEG15K-	277	135
mPEG30K-	300	167
br-mPEG10K-	247	138
br-mPEG20K-	265	150

[実施例9] PEG修飾EPOの分子量測定(2)

実施例8(PEG修飾EPOの調製)と同様の方法で得た各種PEG修飾EPO溶液の溶媒をCentricon-50を利用してQ水に置換、濃縮した。実施例2記載の条件と同様にMALDI-ToF-MSの測定を行った。また、ToF-MS測定に供した試料残渣をPBSで稀釀し、実施例2記載の条件と同様にゲル濾過を行なった。実施例8のmPEG 10K-とmPEG15K-と同条件下にゲル濾過カラムクロマトグラフィー(GPC)に供してその溶出時間を求めた。

但し、mPEG30K-EPOについては濃縮液を2分し、一方をToF-MS測定、他方をGPCに供した。また、br-mPEG10K-EPOsおよびbr-mPEG20K-EPOsについてはGPCで溶出時間を求めた画分を回収、Q水に溶媒置換してMALDI-ToF-MS測定に供した。結果を表8に示した。

表8 PEG修飾EPOの分子量

PEG	Sample	Molecular weight (Da)		
		Calculated	ToF-MS	GPC
Linear PEG	EPO	29000 ¹⁾	28400	70000
	mono-mPEG5000-EPO	34100	33800	114000
	di-mPEG5000-EPO	39200	38900	161000
	mono-mPEG20000-EPO	50000	49800	402000
	di-mPEG20000-EPO	71000	71300	914000
	mono-mPEG30000-EPO	60500	59900	606000
Branched PEG	di-mPEG30000-EPO	92000	93000	(1620000) ²⁾
	mono-br-mPEG10000-EPO	39600	39600	161000
	di-br-mPEG10000-EPO	50200	50300	267000
	mono-br-mPEG20000-EPO	50000	49700	316000
	di-br-mPEG20000-EPO	71000	71500	649000
	mono-br-mPEG40000-EPO	71000	71200	823000
	di-br-mPEG40000-EPO	113000	113000	(2080000) ²⁾

1) 臨床医薬6巻Suppl. 2 (5月) 1990 p. 24 EPOCHの推定分子量(化学分析法)

2) 検量線範囲を超えるので参考値

10

[実施例10] PEG修飾EPOのEPO依存性細胞に対する細胞増殖活性の測定(2)

EPO依存的に増殖するBaF/Ep0R細胞(Blood, 90, 1867-、1997, PNAS, 93, 9471-、1996)を、1%FCS含有RPMIで2回再懸濁と遠心分離を繰り返して洗浄した後に10%FCS含有RPMIにて 1×10^5 細胞/20mLになるように懸濁し、96穴プレートに1穴当たり50マイクロLずつ添加した。一方、測定試料については、10%FCS含有RPMIを希釈液に用いてEPO及びmono-mPEG-EPOの希釈列をそれぞれ調製して、1穴当たり50マイクロLの試料液をn=3であらかじめBaF/Ep0R細胞を添加した96穴プレートに添加して混合し、37℃、5%CO₂加湿下で24時間培養した。各穴に、1穴当たり10マイクロLのCell Count Reagent SF(ナカライトスク社製)を添加して450nmと620nmの波長で吸光度を測定して0時間の測定値とした。さらに室温で5時間静置して450nmと620nmの波長で吸光度を測定した結果をグラフ化した(図10および11参照、図中のmonoはmono-mPEG-EPO、Ep0はrhEPOの意)。得られた結果について、用量-反応性について活性値50%を挟む2点を基に直線回帰し、ED50値を求め、表9および10にまとめた。

表9

	ED50(ng/mL)	vs EPO(%)
EPO	0.134	100.0
mono-mPEG10000	0.255	52.5
mono-mPEG15000	0.240	55.6
mono-mPEG20000	0.557	24.0

5

表10

	ED50 (ng/mL)
mono-mPEG5000	0.158
mono-mPEG30000	0.348
mono-mPEG20000	0.374
EPO	0.072

10

[実施例 11] 各種分子量のmono-mPEG-EPOの薬効持続性の測定

投与液溶媒としては、0.05%ラット血清アルブミン、0.05%Tween 20を含む生理食塩水にPEG修飾EPO又はrhEPOを2.5マイクロg/mLに希釈した。投与溶媒のみ（ベヒクル）の投与を陰性対照とした。投与液の調製は投与初日に行った。本実施例では、Slc:SD系雄性ラット（日本エスエルシー株式会社）を7～8週齢にて実験に供した。被検物質投与日に赤血球数が各群ほぼ同じになるよう1群5匹ずつ7群に割り付けた。

ベヒクル投与群、rhEPO投与群、mono-mPEG5K-EPO投与群、mono-mPEG10K-EPO投与群、mono-mPEG15K-EPO投与群、mono-mPEG20K-EPO投与群、mono-mPEG30K-EPO投与群の7群を設定し、1群5匹とした。投与は2mL/kgの容量（試料濃度5マイクロg/kg）で単回尾静脈内投与した。

投与初日、投与後2、4、5、7、10、15、21、29、35日に無麻酔下でラットを保定器に保定し、尾静脈に注射針を刺し、傷口より流出する血液を採取して試料とした。各試料について、網状赤血球数及びヘモグロビン値について測定した。ヘモグロビン値はマイクロセルカウンター（Sysmex F-80

0、東亜医用電子株式会社製)で測定した。

さらに、網状赤血球数の増加量と増加期間を反映した薬効評価の指標として、投与後15日までの網状赤血球数のAUC(Reti-AUC)を台形法により算出した。

測定の結果は、図12(末梢網状赤血球数の変化)、図13(ヘモグロビン値)、
5 図14(網状赤血球数のAUC)に示した。

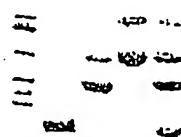
[産業上の利用可能性]

糖鎖に富む糖タンパクである天然型EPOの生理活性を損なうことなく、薬効持続性を高めるために、制御された結合位置、結合分子数でPEGを導入して製
10 造された、極めて高い薬効持続性を有するPEG修飾EPOが開発された。このPEG修飾EPOは、天然型EPO本来の造血作用を損なうことなく、高い薬効持続性を有するので、例えば、患者への投与回数を著しく減らすことができ、患者の投与時の苦痛の軽減が達成でき、また通院回数を減らすことで病気の患者の
15 通院にかかる肉体的、時間的負担の軽減が達成でき、更に、極めて多忙で労働条件の厳しい医療従事者すなわち医師や看護婦、薬剤師等の作業とそれにかかる時間の軽減が達成でき、総じて医療コストの削減が達成できる。

請 求 の 範 囲

1. 天然型ヒトエリスロポエチン（天然型EPO）がポリエチレングリコール（PEG）で化学修飾されたモノPEG修飾EPO。
2. 天然型EPOの52位のリジン残基がPEGで化学修飾された請求項1記載のモノPEG修飾EPO。
3. 天然型ヒトエリスロポエチン（天然型EPO）の修飾に用いるポリエチレングリコール（PEG）の分子量が5～40kDaであるモノPEG修飾エリスロポエチン（PEG修飾EPO）であって、モノPEG修飾EPO1分子のゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより測定した水系溶媒中における見掛けの分子量が100～900kDaである請求項1又は2記載のモノPEG修飾EPO。
4. 前記請求項1、2又は3記載のモノPEG修飾EPOを含有するモノPEG修飾EPO組成物。
5. 請求項1、2又は3記載のモノPEG修飾EPO及び／又は天然型EPOのアミノ酸残基のうち2残基以上がPEG修飾された1分子のゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより測定した水系溶媒中における見掛けの分子量が100～900kDaであるPEG修飾EPOを更に含有するPEG修飾EPO組成物。
6. 前記請求項1、2又は3記載のPEG修飾EPOを有効成分として含有する薬効持続性エリスロポエチン製剤。
7. 前記請求項4又は5のいずれかに記載のPEG修飾EPO組成物を有効成分として含有する薬効持続性エリスロポエチン製剤。
8. 天然型EPOに、PEGのサクシンイミジルエステル誘導体を反応させることから成る、前記請求項4記載のPEG修飾エリスロポエチン組成物の製造方法。

図 1



M E 1 2 R

PEG 修飾 EPO の 4-15% グラジエントゲル SDS-PAGE.

M:MW マーカー (53, 76, 116, 170, 212 (kDa))

E:EPO

1:mono-mPEG-EPO

2:di-mPEG-EPO

R:PEG 修飾 EPO 反応混合物

図 2

PEG(1)-EPO のPEG 結合部位固定

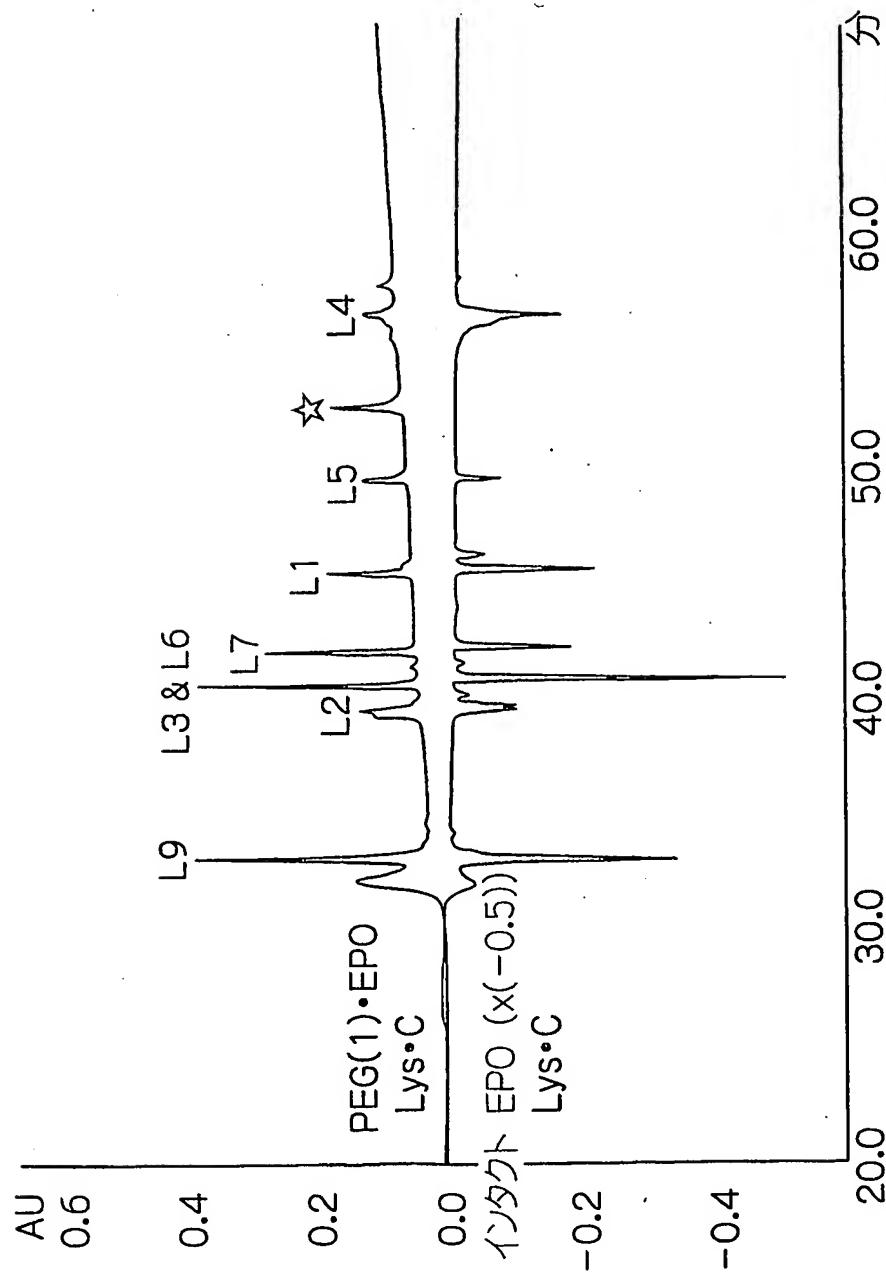


図 3

PEG-EPO の BaF/EpoR 細胞に対する増殖活性

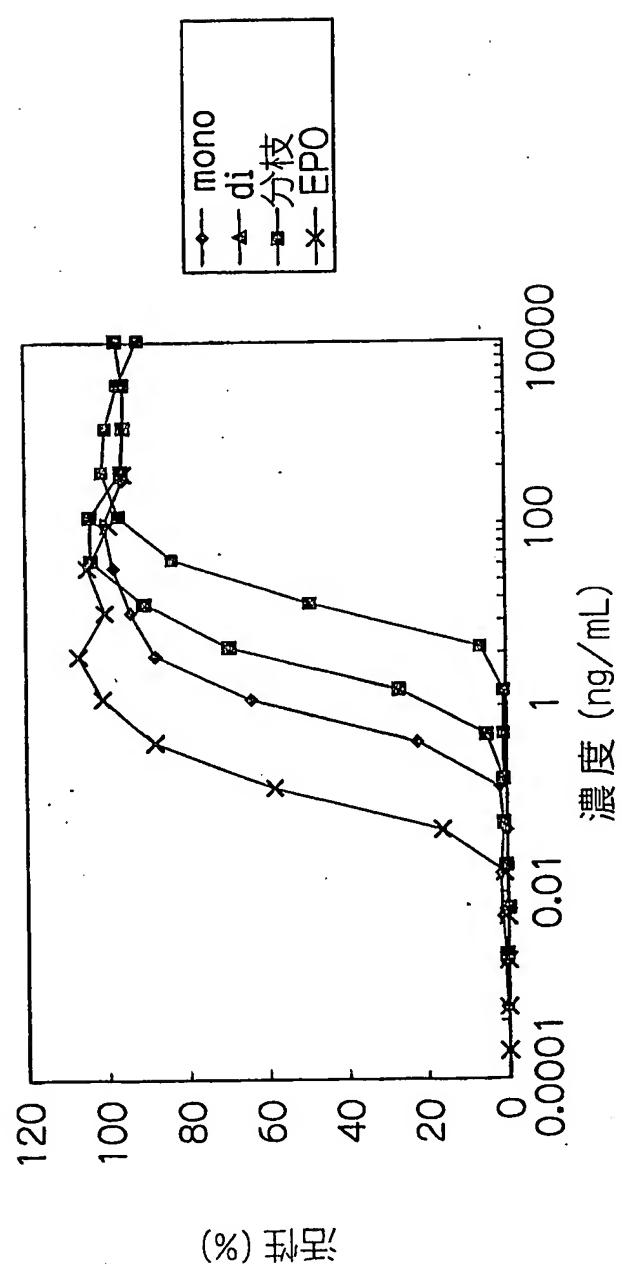


図 4

末梢網状赤血球数の経時変化

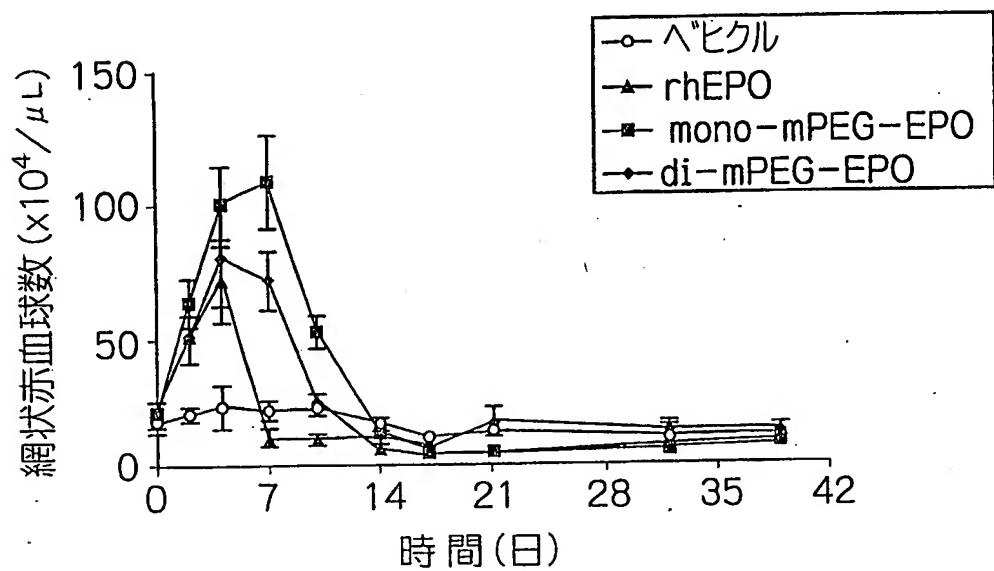


図 5

ヘモグロビン値の経時変化

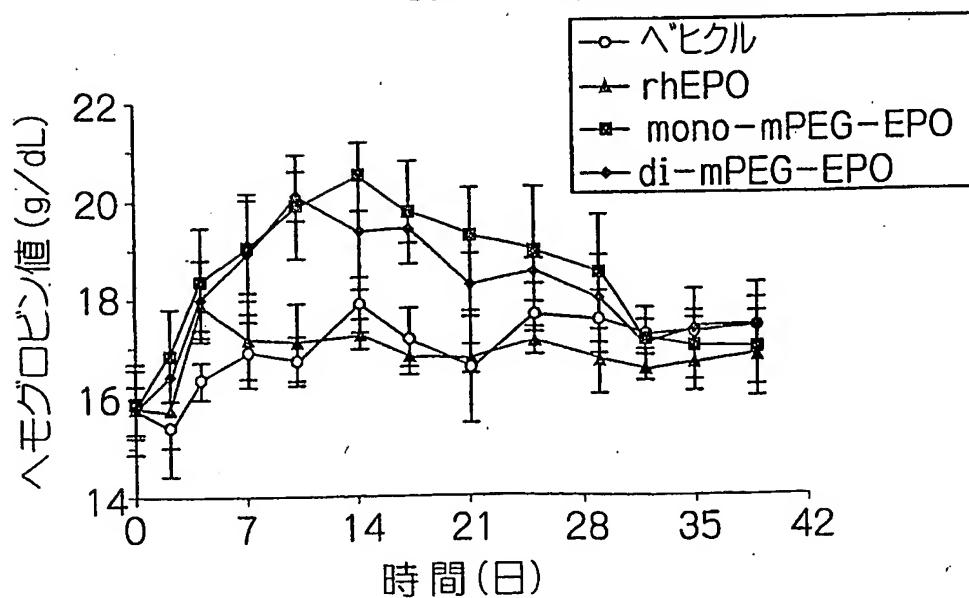


図6 株消網状赤血球数の経時変化

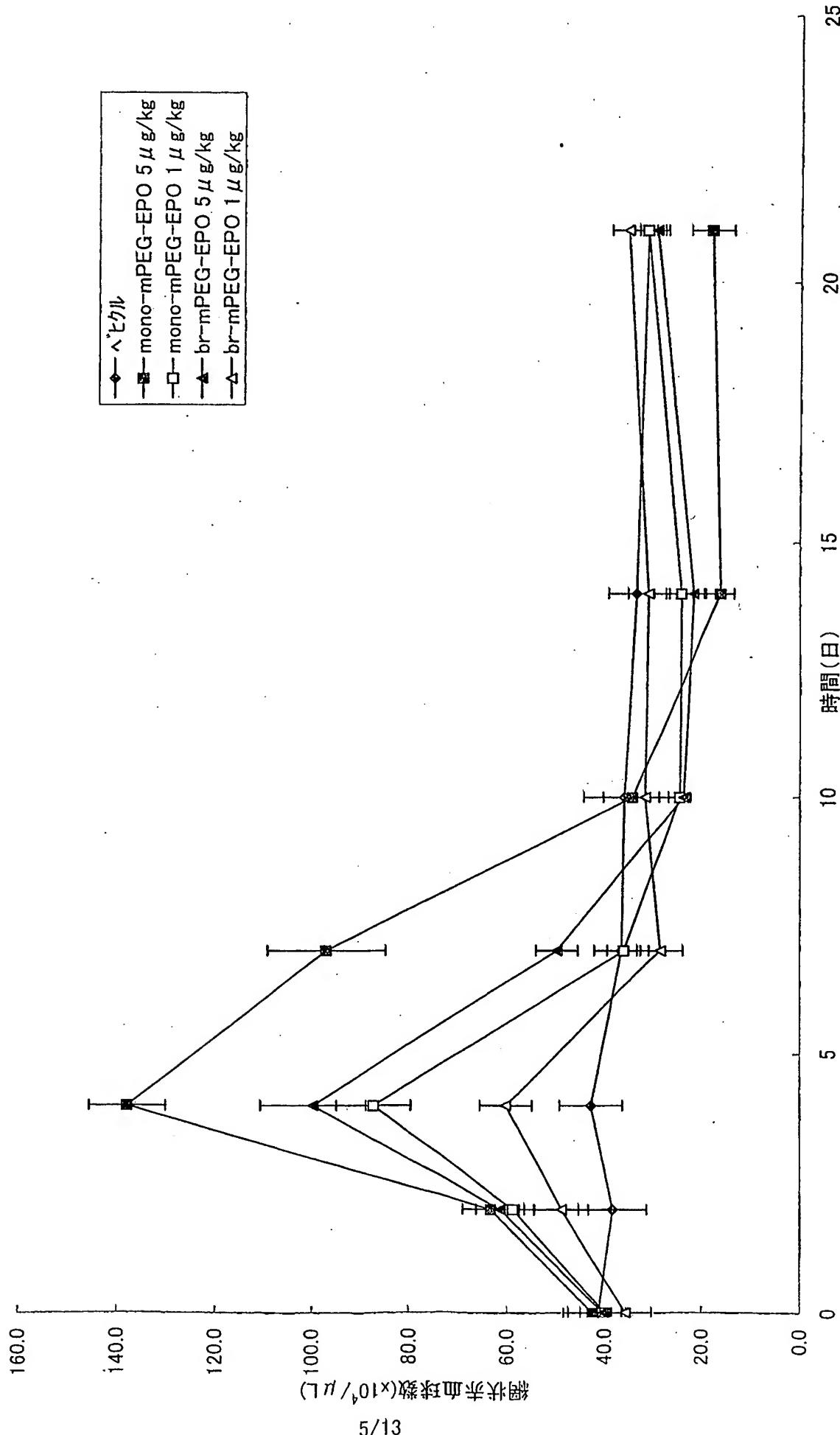


図 7

ヘモグロビン値の経時変化

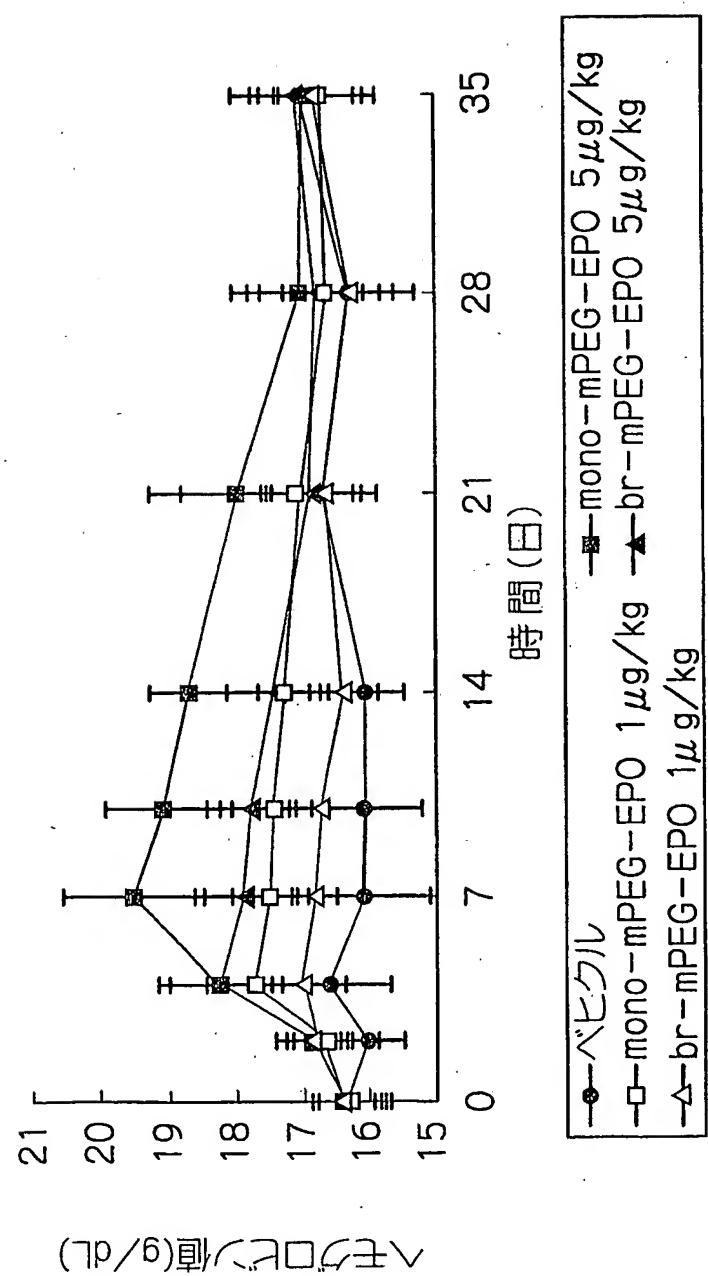


図 8

PEG(1)-EPO 及び EPO の用量依性

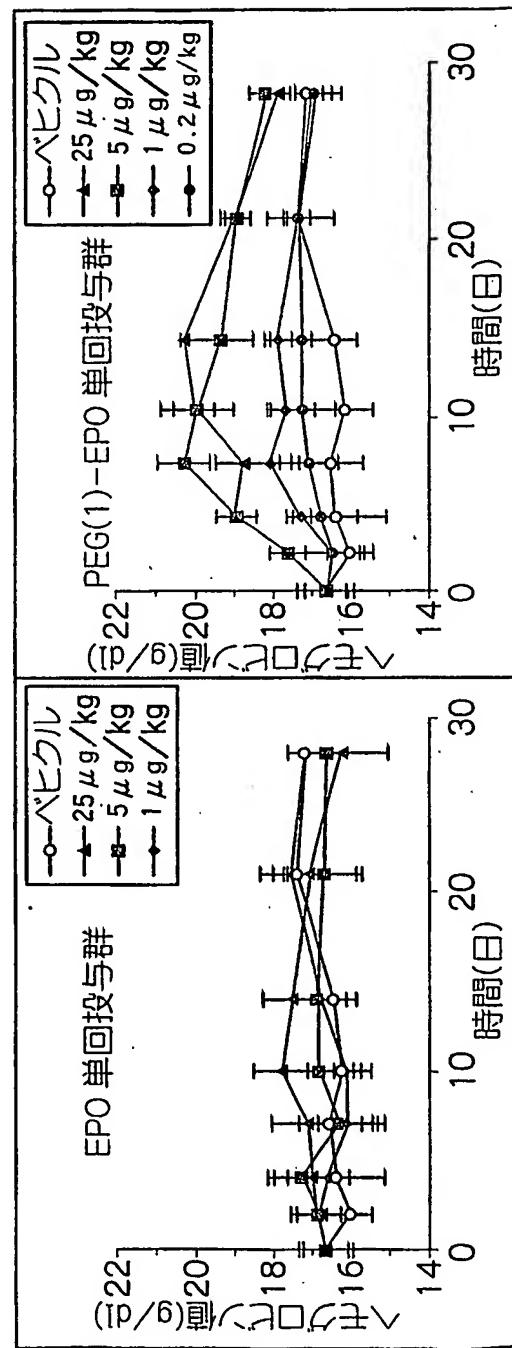
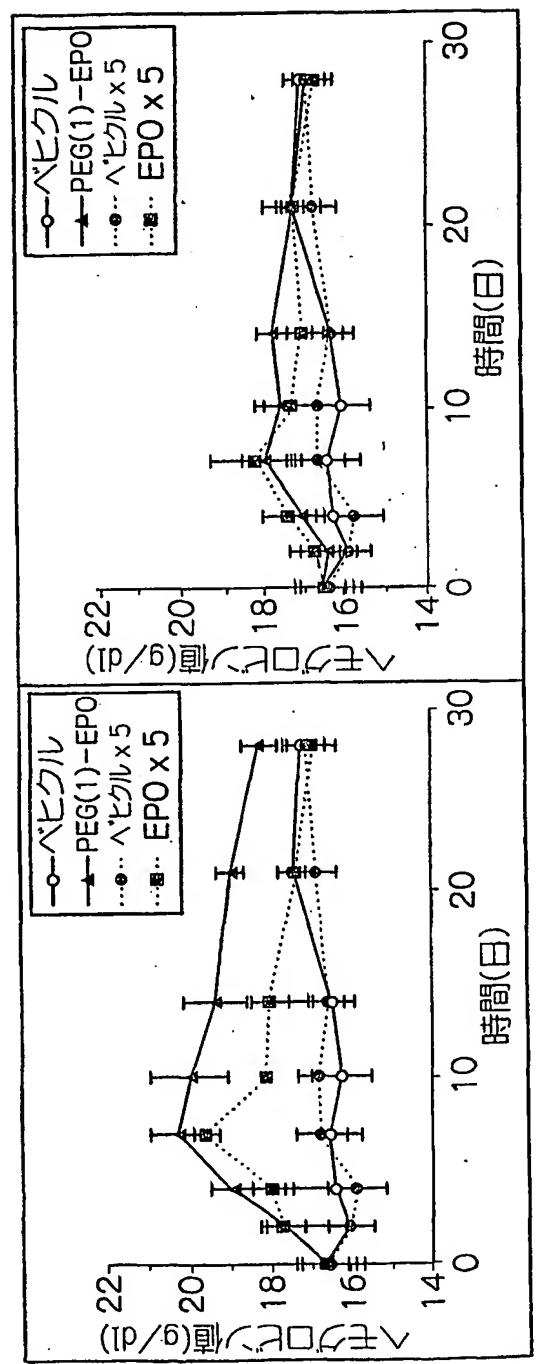


図 9

PEG(1)-EPO 及び EPO 単回投与と EPO 5日間連続投与との比較



PEG (1) - EPO 17.5マイクロ g/kg
 EPO 1マイクロ g/kg × 5
 PEG (1) - EPO 17.5マイクロ g/kg × 5
 EPO 0.2マイクロ g/kg × 5

図10 PEG-EPOのBaF/EpoR細胞に対する増殖活性

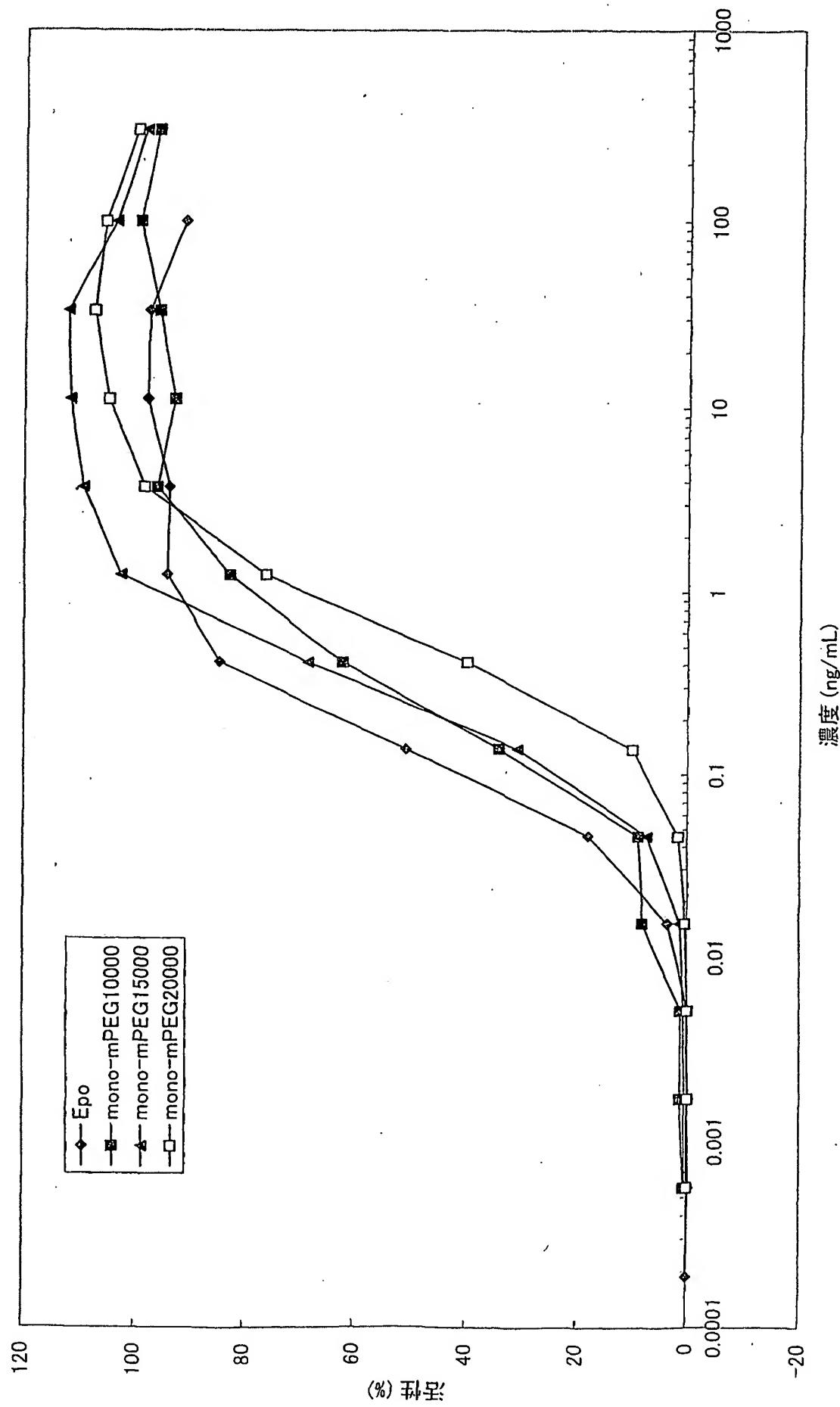


図11 PEG-EPOのBafF/EpoR細胞に対する増殖活性

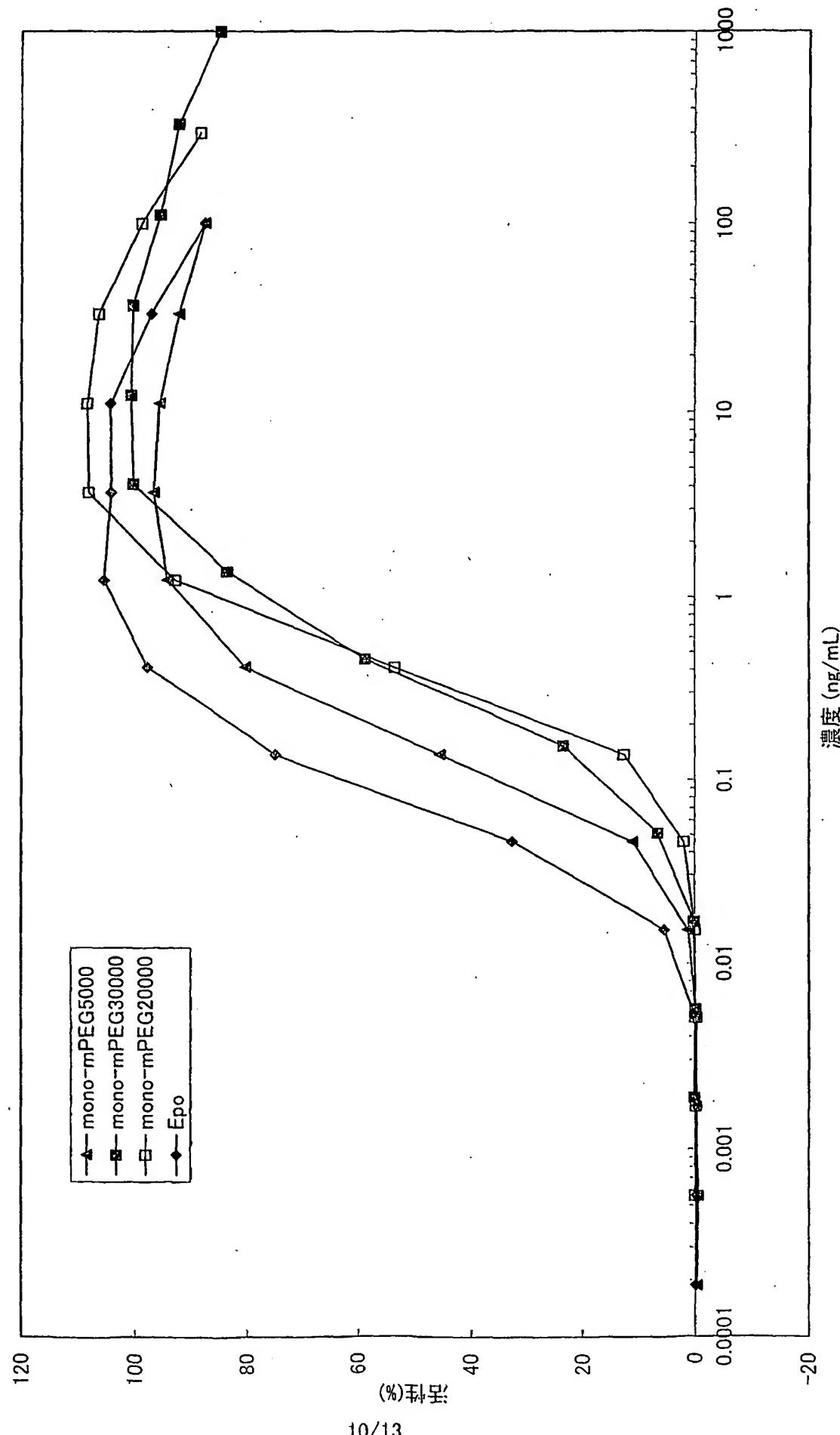


図12 繩状赤血球数の経時的変化

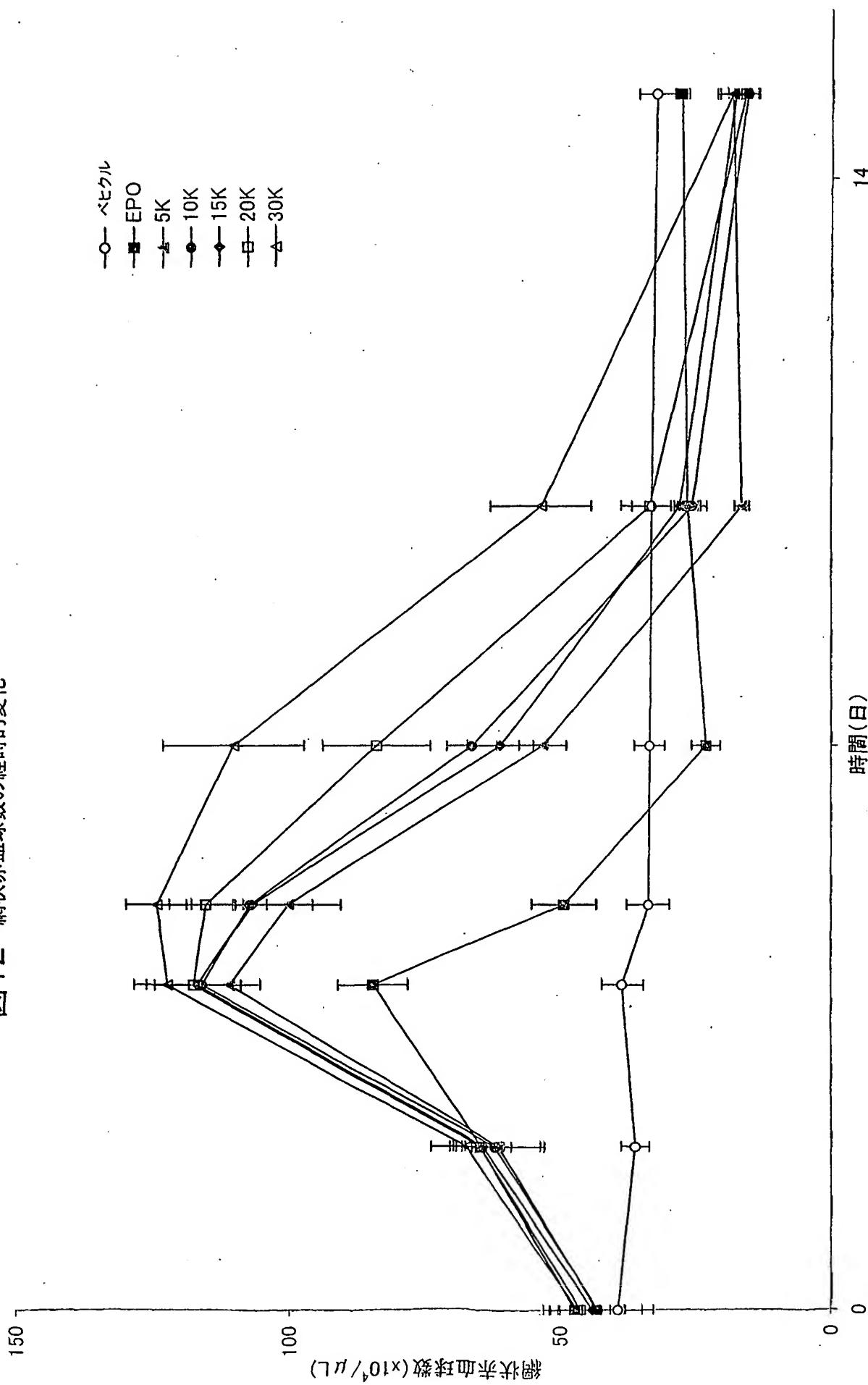


図13 ヘモグロビン値の経時的変化

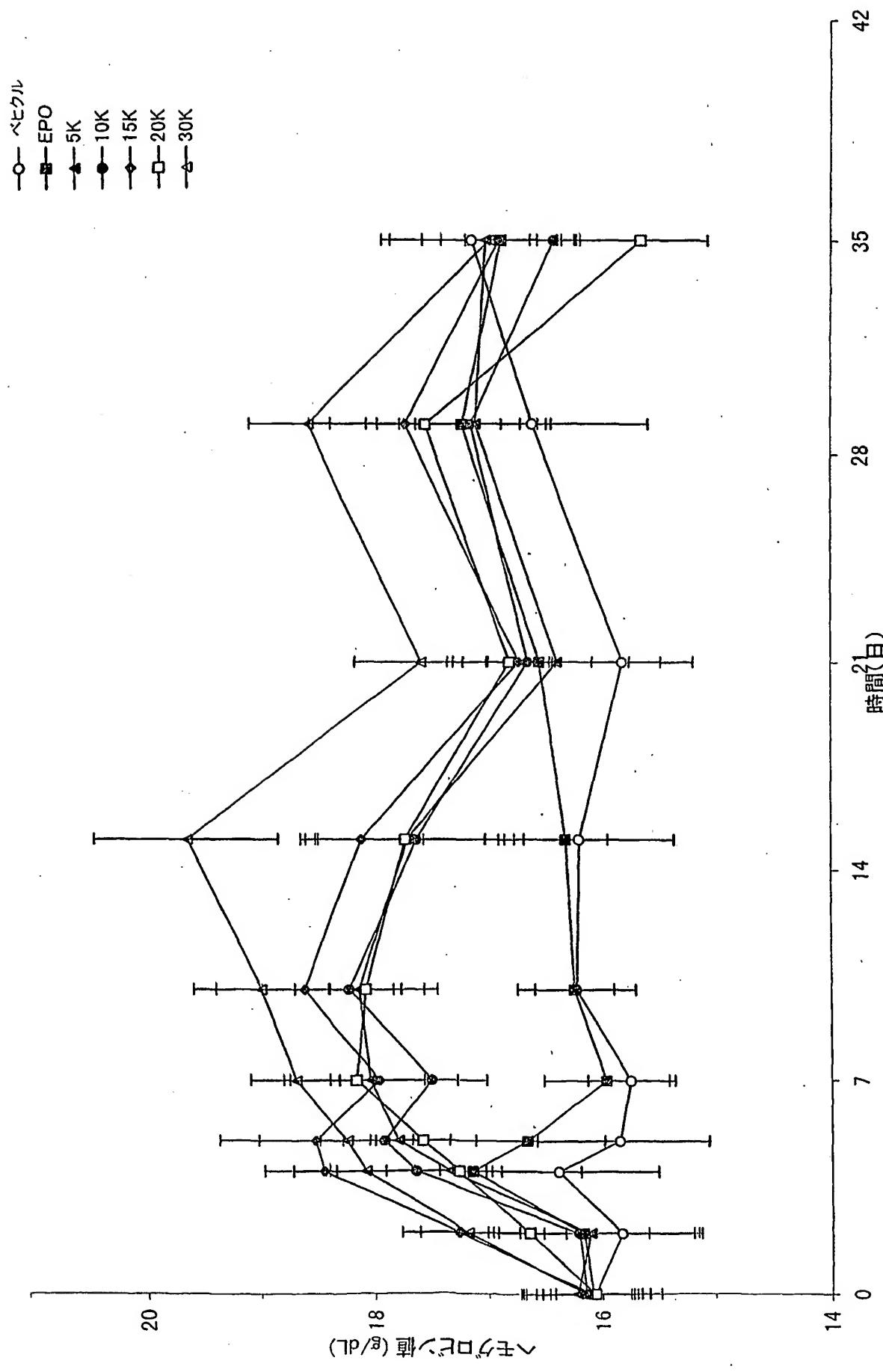
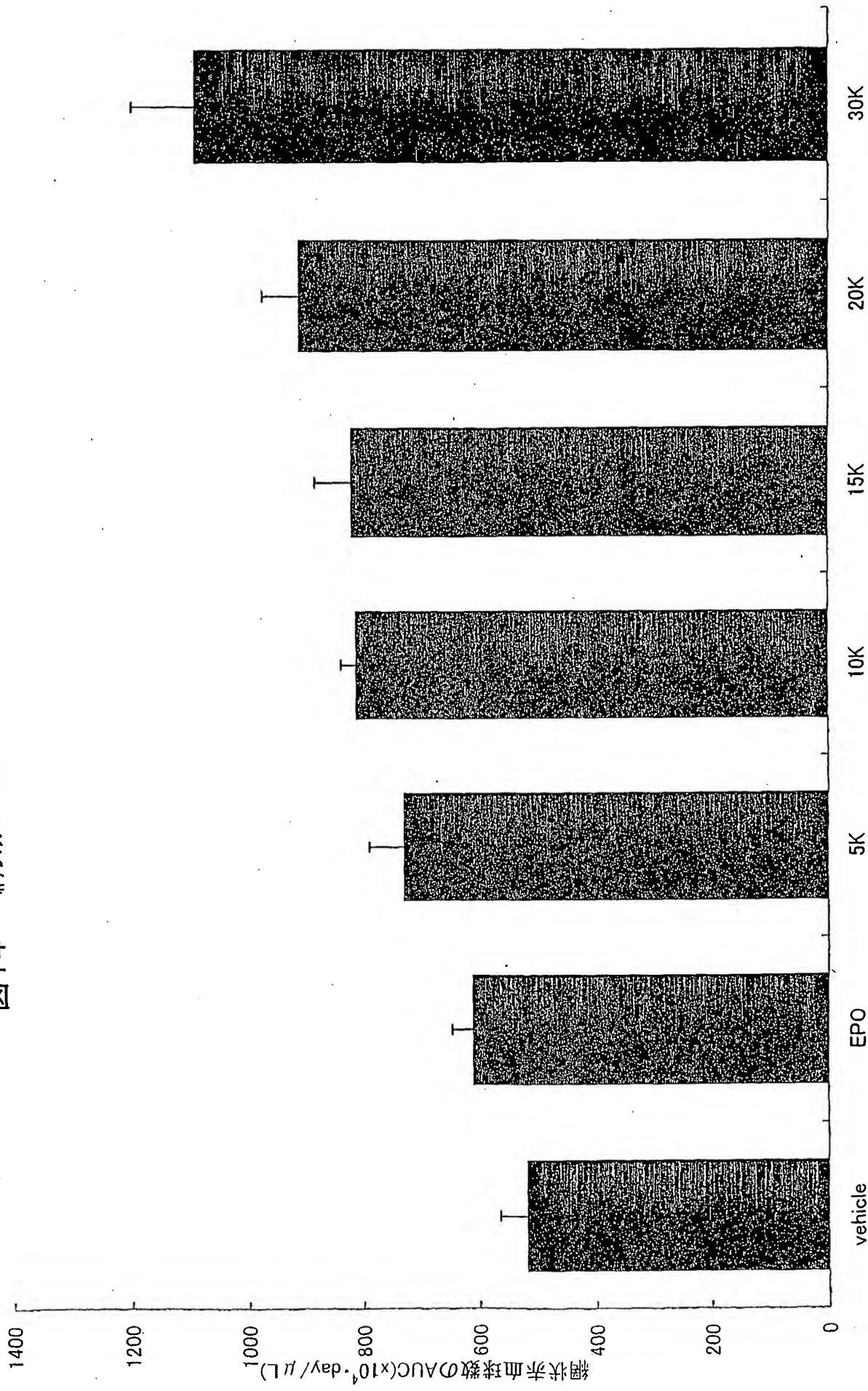


図14 網状赤血球数のAUC



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08539

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/505, A61K38/32, A61K47/48, A61K47/34, A61P7/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/505, A61K38/32, A61K47/48, A61K47/34, A61P7/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 9-25298 A (Amgen Inc.), 28 January, 1997 (28.01.97), & WO 96/11953 A1 & EP 733067 A1 & US 5824784 A & DE 69509628 E	1, 3-8
Y	WO 96/28475 A1 (Toshikazu NAKAMURA), 19 September, 1996 (19.09.96), & EP 816381 A1 & JP 8-527463 A & US 5977310 A	1, 3-8
Y	JP 2-502646 A (Shaw Gray), 23 August, 1990 (23.08.90), & WO 89/05824 A & EP 355142 A & US 4904584 A & AU 8929111 A	1, 3-8
Y A	JP 2-9900 A (Kirin Amujiien Inc.), 12 January, 1990 (12.01.90) (Family: none)	1, 3-8 2

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 November, 2001 (02.11.01)Date of mailing of the international search report
13 November, 2001 (13.11.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C07K14/505, A61K38/32, A61K47/48, A61K47/34,
A61P7/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C07K14/505, A61K38/32, A61K47/48, A61K47/34,
A61P7/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE(STN), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 9-25298 A(アムジ エン インコーポレーテッド)28.1月.1997(28.01.97) & WO 96/11953 A1 & EP 733067 A1 & US 5824784 A & DE 69509628 E	1, 3-8
Y	WO 96/28475 A1(中村 敏一)19.9月.1996(19.09.96) & EP 816381 A1 & JP 8-527463 A & US 5977310 A	1, 3-8
Y	JP 2-502646 A(シャウ グレイ)23.8月.1990(23.08.90) & WO 89/05824 A & EP 355142 A & US 4904584 A & AU 8929111 A	1, 3-8

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献(理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論
の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.11.01

国際調査報告の発送日

13.11.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N 8114

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2-9900 A(カリソアムジエン・インコーポレーテッド) 12.1月. 1990 (12.01.90)	1, 3-8
A	ファミリーなし	2